

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-99899

(43)公開日 平成5年(1993)4月23日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 27/447				
A 6 1 K 39/395		B 8413-4C		
B 0 1 D 57/02		7726-4D		
C 1 2 N 1/00		N 7236-4B		
		7235-2J		
			G 0 1 N 27/ 26	3 3 1 C

審査請求 未請求 請求項の数4(全5頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平3-237832	(71)出願人	000005108 株式会社日立製作所 東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地
(22)出願日	平成3年(1991)9月18日	(72)発明者	保田 健二 茨城県勝田市市毛892番地 株式会社日立 製作所計測器事業部内
		(72)発明者	高田 芳矩 茨城県勝田市市毛892番地 株式会社日立 製作所計測器事業部内
		(74)代理人	弁理士 高田 幸彦

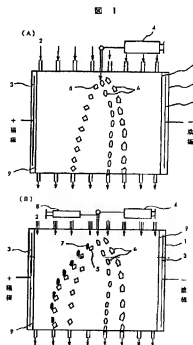
(54)【発明の名称】 生体物質の分離精製法

(57)【要約】

【目的】本発明は、生体物質の無担体電気泳動法による分離精製効果を向上する方法を提供する。

【構成】無担体電気泳動工程の直前または途中に、分離対象物質と異なる電気泳動度を有し、分離対象物質と反応しうる物質を加える工程を設ける。

【効果】生体物質の活性や機能にもとづく無担体電気泳動分離が可能になり、より高機能性の分離対象物質が大量に得られる。



#### 【特許請求の範囲】

【請求項1】無担体電気泳動工程を有する分離精製法において、電気泳動による分離工程の直前または途中で、分離対象物質と異なる電気泳動度を有し、かつ上記分離対象物質と反応しうる特性を有する電気泳動可能な物質を、上記分離対象物質を含む流体中に添加することにより、上記分離対象物質を選択的に分離することを特徴とする生物物質の分離精製法。

【請求項2】上記分離対象物質が、蛋白質、核酸、オルガネラ、生体膜、及び細胞の内のいずれかであることを特徴とする、請求項1に記載の生物物質の分離精製法。

【請求項3】上記電気泳動可能な物質が、抗原または抗体であることを特徴とする、請求項1に記載の生物物質の分離精製法。

【請求項4】上記電気泳動可能な物質は、上記分離対象物質と異なる電気泳動度を付与できる物質を反応性物質に結合させることにより調製されることを特徴とする、請求項1に記載の生物物質の分離精製法。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は生物物質の分離精製法に関するもので、特に医薬品やファインケミカル、食品等の製造過程に好適な分離精製方法に関するものである。

##### 【0002】

【従来技術】生物物質の分離精製法として、無担体電気泳動法は、分離後の処理が容易である、大量の連続精製が可能である、他の分離手段との接続が可能である、担体を調製する必要が無い、巨大分子でも分離可能、等の特長があるが、生物物質の機能にもとづく分離は困難であった。例えば、クルト・ハンニク、ハンス・ジー、ハイドリッヒ等『フリーフロー・エレクトロフォーシス』(G I T Verlag (Darmstadt, Germany)刊行、1990年)(Kurt Hannig and Hans-G. Heidrich; Free-flow Electrophoresis)の第1頁から第19頁までにおいて論じられているように、無担体電気泳動法はもっぱら生物物質の電荷の大きさに基づいて分離を行なっている。

##### 【0003】

【発明が解決しようとする課題】上記従来技術は生物物質の活性や機能にもとづく分離が困難なので、精製した物質の活性や機能が損なわれている場合があり、精製度ははたがって有用性はなくなってしまう場合があった。また試料に電気泳動度の類似した成分が多く含まれる場合には、分離対象物質を電気泳動度だけで分離するのは極めて困難である。無担体電気泳動法の有用性をさらに高めるには、生物物質の活性や機能に対応する分離補助手法が必要である。

【0004】本発明の目的は、無担体電気泳動法を用いる生物物質の分離精製法において、生物物質の活性や機能に対応する分離補助手法を組み入れることにより、よ

り高純度の生物物質が得られるようにすることにある。

##### 【0005】

【課題を解決するための手段】無担体電気泳動工程の直前または途中で、試料を含む流体に、分離対象物質と異なる電気泳動度を有し、かつ分離対象物質と反応しうる特性を有する電気泳動可能な物質を添加すれば、分離対象物質とこの反応性物質との反応複合体は、電気泳動度が元の電気泳動度と異なり、別の分取画分に分離できるようになり、また活性や機能の失われた分離対象物質とは区別できるようになる。分離対象物質としては、電荷を有する生物物質で有用な機能をもつものなら何でもよいが、特に抗原、抗体、酵素、ホルモン、受容体、サイトカイン、オルガネラ、ポリヌクレオチド、血球、微生物細胞、動植物細胞などがこのような反応性を有するので適している。したがって、これらと反応する物質を添加させることで、上記の分離が可能になる。すなわち、抗原や抗体、受容体、相補性ヌクレオチドなどを意識し、添加するのである。また電気泳動度を変えるために、これらに電荷の大きい物質を結合させた後使用することも可能である。

##### 【0006】

【作用】無担体電気泳動法は分離用流体に電場をかけ、物質を移動させ、目的成分を分取するが、電気泳動度の差が分離能を左右する。流体中で電気泳動を行なうので、分子量が大ききものでもゲル電気泳動法と異なり、分離可能である。機能を有する生物物質と反応する物質が、分離対象物質の電気泳動度を大きく変化させるようにしておけば、機能を有する生物物質だけを取り出すことができるようになる。そこで等電点が分離対象物質から0.5以上異なる抗原や抗体、受容体、相補性ヌクレオチドなどを用意して分離できるようにした。また陽イオンや陰イオン性の物質をこれらの蛋白質やヌクレオチドに結合させて等電点を変えすることも可能であった。これらの反応性物質は分離対象物質と非常に速く反応し、可逆的に結合するので、無担体電気泳動工程の直前または途中で反応を行なわせることが可能であった。また分離した後反応複合体から分離対象物質を分けることも通常の分離法で容易に行なえた。

【0007】本発明の原理を図1を用いて説明する。通常の無担体電気泳動工程は図1(A)に示すように、電気泳動セル1に、キャリア流体2を電場の方角に対して直角の方角に流す。このキャリア流体2の流れに分離対象物質5を含む試料を注入シリンジ4より添加する。試料中の分離対象物質5および共存成分6は電極3から電圧を印加した電場の中で分かれて移動する。本発明では、図1(B)に示すように、試料の注入時に反応性分離補助物質7を同時に加える対象物質5と泳動物質7は反応複合体を形成し、対象物質5の分離画分よりも遅延的に泳動分離される。このようにして反応性のある分離対象物質5だけを得ることができる。活性や機能性を持たない

分離対象物質5は別の分離面に分離される。したがって本発明は従来の電荷だけでなく無担体電気泳動とは異なり、活性や機能性を持つ物質を泳動分離できることになる。

#### 【0008】

【実施例】以下に本発明を実施例にもとづいて説明する。

【0009】（実施例1）抗ヒト $\alpha$ -フェブリン（AFP）を含むウサギの抗血清5mlをウサギの腹水から得た後、図2に示す無担体電気泳動セルに導入した。セルにはあらかじめ10mM、pH7.9のリン酸ナトリウム緩衝液を、2ml/minの流速で各導入チューブに流しておいた。セル両端の白金電極3には直流電圧で500Vを印加しておき、分離できるようにした。抗血清5mlを注入シリンジから10秒かけて導入した。

【0010】注入シリンジ4の先端にこれと接続した別の注入シリンジ8を用意しておき、ヒト $\alpha$ -フェブリン（AFP）を0.05mg/mlの濃度で含有する10mM、pH7.9のリン酸ナトリウム緩衝液10mlを抗血清の注入開始1秒前に注入を始めた。高さ20cmの無担体電気泳動セルを流下する間に、AFPと抗AFP抗体の反応複合体が、抗体やAFP単体の分取画分とは異なる分取画分に分離されてきたことが、分取画分の吸光度およびゲル等電点電気泳動法による分析から分かった。

【0011】各分取画分の吸光度およびゲル等電点電気泳動法の結果を図3及び図4に示す。このようにして得たAFPと抗AFP抗体の反応複合体を含む分取画分にpH2.2のグリシン-塩酸緩衝液を加え、AFPと抗AFP抗体を解離させた。抗AFP抗体はプロティンA-Sepharose CL-4B（Pharmacia Biosystems社）のカラムによりAFPから分離できた。本発明により活性のある抗AFP抗体を無担体電気泳動で分離できることが確かめられた。

【0012】（実施例2）実施例1と同様の試料を分離した。図2に示す無担体電気泳動セルを2台用意し、上下に接続した。ここで上のセルの分離流出チューブと下のセルの注入チューブをつないだ。そして実施例1と同様に、抗ヒト $\alpha$ -フェブリン（AFP）を含むウサギの抗血清を、上側の無担体電気泳動セルに導入した。上側の無担体電気泳動セルの分離流出チューブのうち抗AFP抗体を含む分離流出画分がでくくるチューブに、ヒト $\alpha$ -フェブリン（AFP）を0.05mg/mlの濃度で含有する10mM、pH7.9のリン酸ナトリウム緩衝液10mlを注入ペルプを介して導入できるようにし、下側の無担体電気泳動セルで反応複合体の分離を行なった。この方法により実施例1よりも不純物の少ない反応複合体を含む分取画分が得られた。

【0013】（実施例3）実施例1と同様の試料を分離

した。操作は実施例1と全く同様にを行った。本実施例では、添加したヒト $\alpha$ -フェブリン（AFP）をフルオレセイン-インジコシン酸塩（FITC）であらかじめ標識しておいた（FITC:AFP分子=2:1とした）。FITCはキャリブ流体緩衝液中で陰イオン性を示すので、標識したAFPは無標識のAFPにくらべて、より負の電荷を有することになる。したがって標識AFPと抗AFP抗体の反応複合体は移動度が大きくなった。このように反応性物質にイオン性の標識物質を付与することで、より純度の高い分離が可能となることが確認できた。

【0014】（実施例4）ポリデオキシスクレオチドのことであるpoly(dA)の20merのpH8.7、10mM Tris-ホウ酸緩衝液（poly(dA)を30mg/ml、NaCl 50mM含有）2mlを、無担体電気泳動セルに注入して、pH8.7、10mM Tris-ホウ酸緩衝液（NaCl 50mM含有）を流下させながら電気泳動を行なった。ここでpoly(dT)の20merのpH8.7、10mM Tris-ホウ酸緩衝液（poly(dT)を30mg/ml、NaCl 50mM含有）2mlをpoly(dA)に添加して42℃に120分置いておいてからセルに注入して電気泳動を行なったところ、poly(dA)単独時よりも陽極側の分画位置にポリデオキシスクレオチドが分離されてきた。これにはpoly(dA)とpoly(dT)のハイブリッド二本鎖が含まれていたことが紫外分光分析から確認できた。mRNAにはpoly(A)鎖が3'末端に付属しているから、poly(T)鎖を用いることでmRNAを他のRNAから分離するにも本法を適用することが可能である。一本鎖DNAについても相補型ポリヌクレオチド鎖を用いることで同様な分離が可能である。

（実施例5）健康者の新鮮静脈血25mlからリンパ球を分離し、無担体電気泳動セルを導入した。10mM、pH6.2のリン酸ナトリウム緩衝生理食塩水をキャリブ流体として本発明にもどづく分離を行なった。ここで反応性物質としてリンパ球表面抗原CD4と反応するFITC結合抗CD4抗体液を用いた。無担体電気泳動分離の結果、FITCの蛍光が強いリンパ球画分にT4リンパ球が集中していることが判明した。このリンパ球画分は他のリンパ球画分と容易に区別できた。

#### 【0015】

【発明の効果】本発明によれば、無担体電気泳動法を用いる生物物質の精製法において、生物物質の活性や機能にもとづく分離が可能になり、より高機能性の分離対象物質が得られるようになる。これにより従来クロマトグラフィーでしか分離できなかった成分にも無担体電気泳動法を適用することができるようになる。また無担体電気泳動法の特長である大量分取や連続分取がこれらの成分にも応用でき、生産コストを大幅に下げることが可能になる。

【図面の簡単な説明】

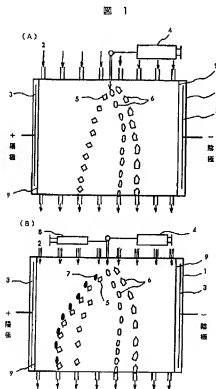
【図 1】 本発明にもとづく分離方法の原理図。

【図 2】 本発明にもとづく電気泳動セルの例を示す図。

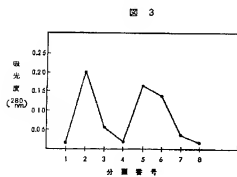
【図 3】 分取した電気泳動分離画分の吸光度を示す図。

【図 4】 分取した電気泳動分離画分のゲル電気泳動プロファイルを示す図。

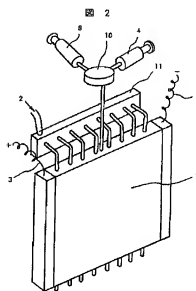
【図 1】



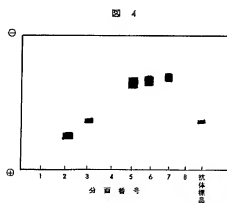
【図 3】



【図 2】



【図 4】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>5</sup>

C 2 5 D 13/04

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

7179-4K